

スおよび E 型肝炎ウイルスは陰性であった。加熱調理用カキは生食用カキと比較してノロウイルスの検出率、定量値とも高く、産地により異なった。検出ノロウイルスの遺伝子型はヒトでの流行を反映したが、ヒトからの検出が少ないにも関わらずカキから比較的多く検出される遺伝子型も認められた。リアルタイム PCR 法では、現状の陽性基準(2 ウェルとも実測値 10 コピー/g 以上)に従うと、偽陰性と判定される割合が少なくないことが示された。

### (2) 下水等の食品媒介ウイルスの汚染実態調査

下水処理工程によりノロウイルスがある程度除去されていることが推察された。

養殖カキにおいて、垂下 10m 層のカキより 2m 層のカキの検出率が高い傾向にあった。

下水、カキ、ヒトから検出されるノロウイルス遺伝子型は大まかには一致するものの、GI.4 が患者数と比較して下水から多く検出されるなど、異なる傾向を示すことも認められた。アストロウイルス、アイチウイルスなどは、臨床検体と比較して下水検体からは高頻度に検出された。下水中のウイルス汚染量はヒトでの流行が拡大する冬季に増加した。

### (3) 食品媒介事例等の疫学的研究および胃腸炎ウイルスのサーベイランス

2012/13～2015/16シーズンにおける食中毒事例、散発性感染性胃腸炎、胃腸炎集団発生事例からのウイルス検出および検出ウイルスの遺伝子解析を実施した。主流ノロウイルス遺伝子型は GII.4\_Sydney2012 であった。それ以外、

流行期や地域により多少様相が異なるものの、種々の遺伝子型のノロウイルスが検出された、ポリメラーゼ領域の解析の結果、多くがキメラウイルスであった。2014/15 シーズンに検出された GII.17 は、小児の感染性胃腸炎患者からはあまり検出されないなど、特徴的な流行状況を示した。サポウイルスによる集団事例はノロウイルスと同一の要因で発生していることが確認できたことから、ノロウイルス同様の対策が必要である。

### 3. 食品のウイルス検査の精度管理体制の確立

ノロウイルスの定量検査において変動要因として検量線作成用 cDNA 溶液が大きな影響を及ぼしていることが明らかとなった。また、検査方法等を限定することにより検査精度が高くなり、これを用いることで外部精度の実施が可能であると考えられた。

各機関のノロウイルス遺伝子検査で実際に使用しているノロウイルス GII 陽性コントロールにおいて最大 280 倍の違いがあった。

A 型肝炎ウイルス、メンゴウイルス、コクサッキー B5 型ウイルスについてコントロール DNA を作製した。

### F. 健康危害情報なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Iritani N, Kaida A, Abe N, Kubo H, Sekiguchi J, Yamamoto SP, Goto K, Tanaka T, Noda M.: Detection and

- genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan., *J Med Virol*, 86(12):2019-2025 (2014)
2. Miranda de Graaf, Janko van Beek, Harry Vennema, Alexander T. Podkolzin, Joanne Hewitt, Filemon Bucardo-Rivera, Kate Templeton, Janet Mans, Johan Nordgren, Reuter Gábor, Maureen Lynch, Lasse Dam Rasmussen, Nobuhiro Iritani, Martin C. Chan, Vito Martella, Katia Balay, Jan Vinjé, Peter A. White, Marion P. Koopmans: Emergence of a novel GII.17 norovirus - End of the GII.4 era?, *Eurosurveillance* 20(26), pii=21178 (2015)
  3. N Iritani, A Kaida, N Abe, H Kubo, J Sekiguchi, SP Yamamoto, K Goto, T Tanaka, M Noda: Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks during 2001-2012 in Osaka City, Japan, *Journal of Medical Virology* 86, 2019-2025 (2014)
  4. Nidaira M, Taira K, Kato T, Arakaki E, Kyan H, Takara T, Okano S, Kuba Y, Kudaka J, Noda M.: Phylogenetic Analysis of Sapovirus Detected from an Outbreak of Acute Gastroenteritis on Ishigaki Island (Okinawa Prefecture, Japan) in 2012, *Jpn J Infect Dis*, 67(2):141-143 (2014)
  5. Saito H, Toho M, Tanaka T, Noda M.: Development of a Practical Method to Detect Noroviruses Contamination in Composite Meals., *Food Environ Virol.*, 2015 Sep;7(3):239-48 (2015)
  6. Yoshida W, Kezuka A, Murakami Y, Lee J, Abe K, Motoki H, Matsuo T, Shimura N, Noda M, Igimi S, Ikebukuro K.: Automatic polymerase chain reaction product detection system for food safety monitoring using zinc finger protein fused to luciferase., *Anal Chim Acta.*, 801:78-83. (2013)
  7. 原田誠也, 大迫英夫, 吉岡健太, 西村浩一, 清田正憲, 李 天成, 石井孝司, 田中智之, 野田 衛: イノシシ, シカおよびブタの E 型肝炎ウイルス感染状況調査-熊本県, *IASR*, 35(1), 9-10 (2014)
  8. 斎藤博之, 野田 衛: 第 4 章 ウィルス 2 各論 1. 食品, 環境材料等の前処理法 (1) 食品, 臨床材料, ふき取りの前処理法, 食品衛生検査指針 微生物編 2015, 607-617 (2015)
  9. 斎藤博之: 一本鎖高次構造多形 (SSCP) 解析法, 食品衛生検査指針 2015 (微生物編), 648-654 (2015)
  10. 斎藤博之, 秋野和華子, 佐藤寛子, 柴田ちひろ, 佐藤由衣子, 安部真理子, 飯塚禮子, 木内雄: 死亡例を含

- む A 型肝炎の家族内感染事例, 病原微生物検出情報, 36(5), p15 (2015)
11. 三好龍也 内野清子 岡山文香 芝田有理 吉田永祥 小林和夫 左近直美 土生川洋 田中智之 野田衛: 臨床検体および下水検体を用いた堺市内の A 型肝炎の流行解析, 病原微生物検出情報, 36, 6-7 (2015)
  12. 三好龍也 内野清子: 下水中ノロウイルス検出情報と流行解析, 臨床とウイルス, 42:237-241, 2014
  13. 山元誠司, 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸, 長谷 篤, 藤森良子, 森宏美, 伯井紀隆, 辻本光広, 半羽宏之: 大阪市におけるロタウイルス感染症集団事例発生状況と流行株の特徴 (2009~2013 年), 病原微生物検出情報 月報 35(No. 409), 67-68 (2014)
  14. 小林慎一, 山下照夫, 皆川洋子: サポウイルス食中毒, 臨床とウイルス, 41, 52-60, (2013)
  15. 上間 匡, 野田 衛: 食事・食品管理の具体的手法-患者・スタッフ・委託業者への啓発, 感染対策 ICT ジャーナル, 320-327 (2014)
  16. 上林大起, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 山元誠司, 入谷展弘, 西尾孝之, 伯井紀隆, 森 宏美, 西貴美, 安井典子, 榊田晴美, 細井舞子, 青木理恵, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 半羽宏之, 松本健二, 吉村高尚: コクサッキーウイルス B4 型が検出された集団胃腸炎について-大阪市, 病原微生物検出情報 月報 36(No. 428), 197-198 (2015)
  17. 上林大起, 左近直美, 入谷展弘, 三好龍也, 改田 厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 内野清子, 吉田永祥, 岡山文香, 芝田有理, 塚田和宏, 駒野淳, 弓指孝博, 西尾孝之, 加瀬哲男, 田中智之, 高橋和郎: 大阪府内におけるノロウイルスの流行状況 (2010-2013), 大阪府立公衆衛生研究所報告 53, 15-21 (2015)
  18. 中根邦彦, 小林慎一: 岡崎市におけるノロウイルス遺伝子型の 6 年間の特徴-2007 年 4 月~2013 年 3 月-, 感染症学雑誌 88(6): 875-877 (2014)
  19. 楠原 一 赤地重宏 小林隆司 西中隆道 小林真美 山口江里 岩出義人 田沼正路 野田 衛: ノロウイルス GII. 17 型の流行とその特徴について-三重県, 病原微生物検出情報, 36, 91-92 (2015)
  20. 入谷展弘 山元誠司 改田 厚 阿部仁一郎 久保英幸 西尾孝之 伯井紀隆 大平真由 安井典子 榊田晴美 細井舞子 松本珠実 坂本徳裕 廣川秀徹 半羽宏之 野田 衛: 2014 年 9~11 月に発生したノロウイルスによる胃腸炎集団事例について-大阪市, 病原微生物検出情報, 36:26-27 (2014)
  21. 入谷展弘, 改田 厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 後藤 薫, 長谷 篤: 2012-2013 シーズンに大阪府で認められたノロウイルス流行, 大阪府立環境科学研究所報告 調査・研究年報 平成 24 年度

- 版 第75集, 18-22 (2013)
22. 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 西尾孝之, 伯井紀隆, 大平真由, 安井典子, 榊田晴美, 細井舞子, 松本珠美, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 半羽宏之, 野田衛: 2014年9~11月に発生したノロウイルスによる胃腸炎集団事例について-大阪市, 病原微生物検出情報月報 36(No. 420), 26-27(2015)
  23. 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 平井有紀, 上林大起, 野田 衛, 西尾孝之: 2014-2015シーズンに大阪府で認められたノロウイルス流行, 大阪府立環境科学研究所報告 調査・研究年報 77, 13-16 (2015)
  24. 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 上林大起, 久保英幸, 野田 衛: 2014~2015シーズンに流行したノロウイルス GII.17 について, 食品衛生研究 65(10), 7-15 (2015)
  25. 福田信治, 野田 衛: 第1章 総論 7 微生物試験における基本的事項 6. 遺伝子検査, 食品衛生検査指針 微生物編 2015, 101-113 (2015)
  26. 野田 衛, 上間 匡: 第3章・第1節 ウイルス, 微生物の簡易迅速検査法, (株)テクノシステム, PP.133-141 (2013)
  27. 野田 衛, 福田 伸治: 第10章・第1節 感染症 4. ウイルスの簡易迅速検査法, 微生物の簡易迅速検査法, (株)テクノシステム, pp. 539-548 (2013)
  28. 野田 衛: ノロウイルス食中毒・感染症からまもる-その知識と対策-, 日本食品衛生協会, 1-107 (2013)
  29. 野田 衛: ノロウイルス食中毒の予防対策, 日本栄養士会雑誌, 58(11), 16-21 (2015) 入谷展弘, 山元誠司, 改田厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 平井有紀, 上林大起, 野田 衛, 西尾孝之: 2014-2015 シーズンに大阪府で認められたノロウイルス流行, 大阪府立環境科学研究所報告 調査・研究年報, 77, 13-16 (2015)
  30. 野田 衛: ノロウイルス食中毒対策-調理従事者からの食品汚染はなぜ起こるのか?-, 月刊「食と健康」平成 26 年 4 月号 (日本食品衛生協会), 8-20 (2014)
  31. 野田 衛: ノロウイルス対策-予防と汚染時の対処法-, 月刊「食と健康」平成 26 年 10 月号 (日本食品衛生協会), 8-19 (2014)
  32. 野田 衛: 汚染リスクを知って予防しよう! ウイルス性食中毒, 食と健康, 706, 8-18 (2015)
  33. 野田 衛: 第4章 ウイルス 1 総論, 食品衛生検査指針 微生物編 2015, 598-606 (2015)
  34. 野田 衛: 第4章 ウイルス 2 各論 2. ウイルス検出・解析法 (2) 核酸抽出, Dnase 処理, 逆転写反応, 食品衛生検査指針 微生物編 2015, 627-632 (2015)
  35. 野田 衛: 第4章 ウイルス 2 各論 4. ウイルス別検査法 (1) ノロウイルス, 食品衛生検査指針 微生物編 2015, 665-684 (2015)
  36. 野田 衛: 第4章 ウイルス 2 各

- 論 4. ウイルス別検査法 (11)  
ネコカリシウイルス, 食品衛生検査  
指針 微生物編 2015, 756-764  
(2015)
37. 野田 衛: 第4章 ウイルス 2 各  
論 4. ウイルス別検査法 (9) A  
型肝炎ウイルス, 食品衛生検査指針  
微生物編 2015, 740-747 (2015)
2. 学会発表
1. Hiroyuki Saito, Tomoyuki Tanaka,  
Miho Toho, Mamoru Noda, Tomoichiro  
Oka and Kazuhiko Katayama  
(2014)Noroviruses RNA detection in  
contaminated foods by a PANtrap  
method, The 2nd. AFSA Conference on  
Food Safety and Security, Bien Hoa  
City, 8/15-17
  2. Hiroyuki Saito, Wakako Akino,  
Mamoru Noda (2015)パントラ法によ  
って得られたサポウイルス RNA 検出  
系の最適化, 第 63 回日本ウイルス学  
会学術集会, 福岡市, 11/22
  3. Iritani N, Kaida A, Abe N, Kubo H,  
Sekiguchi J, Yamamoto SP, Goto K,  
Tanaka T, Noda M. (2014)Detection  
and genetic characterization of  
human enteric viruses in  
oyster-associated gastroenteritis  
outbreaks between 2001 and 2012 in  
Osaka City, Japan., J Med Virol,  
86(12):2019-2025
  4. Mayumi Nagoya, Noriko Inasaki,  
Ichiyo Shima, Masae Itamochi, Ryo  
Inahata, Masatsugu Obuchi, Mamoru  
Noda, Tetsutaro Sata, Takenori  
Takizawa(2015)胃腸炎集団発生事  
例のメタゲノム解析によるノロウイ  
ルスの検索, 第 36 回日本ウイルス学  
会学術集会, 福岡市, 11/22
  5. Moi K., Noda M., Somura Y., Hayashi  
Y., Kai A. (2013)Comparison of the  
virus-antibody complex in fecal  
specimens from symptomatic and  
asymptomatic patients., The 5th  
International Calicivirus  
Conference, 北京市, 10/14
  6. Saito H, Toho M, Tanaka T, Noda M.  
(2015)Development of a Practical  
Method to Detect Noroviruses  
Contamination in Composite Meals.,  
Food Environ Virol., 2015  
Sep;7(3):239-48
  7. Yoshida W, Kezuka A, Murakami Y,  
Lee J, Abe K, Motoki H, Matsuo T,  
Shimura N, Noda M, Igimi S,  
Ikebukuro K. (2013)Automatic  
polymerase chain reaction product  
detection system for food safety  
monitoring using zinc finger  
protein fused to luciferase., Anal  
Chim Acta., 801:78-83.
  8. 稲崎倫子, 名古屋真弓, 成相絵里,  
小和田和誠, 葛口剛, 酢谷奈津, 松  
原祐子, 田中保知, 楠原一, 赤地重  
宏, 小林慎一, 皆川洋子, 小平彩里,  
柴田伸一郎:平成 24 年度の東海北陸  
地区におけるウイルス性胃腸炎の発  
生状況について. 第 61 回日本ウイル  
ス学会学術集会, 神戸市, 平成 25 年  
11 月 11 日

9. 吉富秀亮, 芦塚由紀, 野田 衛 (2015)市販カキから検出されたノロウイルス GII.17 の分子疫学解析, 第 36 回日本食品微生物学会学術総会, 川崎市, 11/30
10. 吉富秀亮, 芦塚由紀, 野田衛: 市販カキから検出されたノロウイルス GII.17 の分子疫学解析, 第 36 回日本食品微生物学会, 川崎市, 11 月 13 日, 2015
11. 溝口嘉範, 磯田美穂子, 木田浩司, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 安原広己, 上間 匡, 野田 衛 (2013)感染性推定遺伝子検査法の下水中のノロウイルス検出への応用, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 宜野湾市, 11/22
12. 溝口嘉範, 木田浩司, 葛谷光隆, 磯田美穂子, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 上間 匡, 野田 衛 (2013)エコーウイルス 9 型定量系によるノロウイルス通知法の評価, 第 34 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/3
13. 佐藤裕徳, 横山勝, 本村和嗣, 中村浩美, 田村務, 吉澄志磨, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田衛, 田中智之, Norovirus Surveillance Group of Japan (2014)ヒト集団におけるノロウイルス流行株の多様性と進化, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜市, 11/11
14. 佐藤裕徳, 本村和嗣, 横山 勝, 中村浩美, 岡 智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田 衛, 田中智之 (2013)ノロウイルス GII.4 2006b のカプシドと酵素に働くアミノ酸変化の制約, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 11/12
15. 斎藤 博之, 秋野 和華子, 田中 智之, 野田 衛 (2014)食中毒事例における食品のサポウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化, 第 108 回日本食品衛生学会, 金沢市, 12/5
16. 斎藤 博之, 秋野和華子, 野田 衛 (2015)食品のサポウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化, 第 36 回日本食品微生物学会学術総会, 川崎市, 11/12
17. 斎藤 博之, 秋野 和華子, 田中 智之, 野田 衛 (2015)食品検体の病原ウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の捕捉抗体供給源に関する検討, 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 京都市, 10/30
18. 斎藤博之, 秋野和華子, 田中智之, 野田 衛 (2014)食品検体のノロウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の捕捉抗体供給源に関する検討, 第 35 回日本食品微生物学会学術総会, 堺市, 9/19
19. 斎藤博之, 秋野和華子, 田中智之, 野田衛 (2014)パンソルビン・トラップ法における捕捉抗体としての工業用ガンマグロブリンの有用性の検証, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜市, 11/10
20. 斎藤博之, 東方美保, 岡智一郎, 片山和彦, 田中智之, 野田 衛 (2013)食品検体からのパンソルビン・トラ

- ップ法で抽出したノロウイルス RNA の検出系に関する検討, 第 34 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/3
21. 斎藤博之, 東方美保, 岡智一郎, 片山和彦, 田中智之, 野田衛 (2013) 食中毒事例における食品のノロウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 宜野湾市, 11/22
  22. 斎藤博之, 東方美保, 岡智一郎, 片山和彦, 田中智之, 野田 衛 (2013) パンソルビン・トラップ法によって得られたノロウイルス RNA の効率的な検出に関する検討, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 11/12
  23. 三元 昌美, 上間 匡, 堀内 百恵, 野田 衛 (2014) 感染性推定遺伝子検査法を用いたノロウイルスの加熱不活化における生存性の推定, 第 108 回日本食品衛生学会, 金沢市, 12/5
  24. 三元昌美, 上間 匡, 野田 衛 (2014) 市販洗剤添加エタノールのネコカリシウイルスに対する不活化効果, 第 35 回日本食品微生物学会学術総会, 堺市, 9/18
  25. 三元昌美, 上間 匡, 栗原慶隆, 野田 衛 (2013) 感染性推定遺伝子検査法を用いたノロウイルスの乾燥状態および液体中の生存性の推定, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 宜野湾市, 11/22
  26. 三元昌美, 小菅大嗣, 上間 匡, 野田 衛 (2015) 感染性推定遺伝子検査法を用いた高圧処理によるノロウイルスに対する不活化効果の検証, 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 京都市, 10/30
  27. 三好龍也 内野清子 岡山文香 芝田有理 左近直美 田中智之 野田衛 小林和夫: 堺市内における下水サンプルを用いた A 型肝炎ウイルスの流行解析, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜市 2014. 11
  28. 山下育孝, 青木里美, 菅 美樹, 服部昌志, 大倉敏裕, 野田 衛, 岡 智一郎, 四宮博人 (2013) 愛媛県におけるサポウイルス GI. 2 株の流行, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 11/12
  29. 山下照夫, 安達啓一, 伊藤 雅, 廣瀬 絵美, 中村範子, 尾内彩乃, 安井善宏, 小林慎一, 皆川洋子: 下水から検出されるコブウイルスの長期的遺伝子解析, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡市, 11/22 (2015)
  30. 山元誠司, 改田 厚, 久保英幸, 入谷展弘: ユニークな G3 型 VP7 遺伝子を有するロタウイルス DS-1 様 G3P[8] 株の遺伝子解析, 第 62 回日本ウイルス学会, 横浜 (2014. 11. 10-12)
  31. 山元誠司, 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸, 西尾孝之: 大阪市におけるロタウイルス遺伝子構成の変遷: Wa から DS-1, 平成 26 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会総会, 神戸 (2014. 10. 3)
  32. 山元誠司, 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸, 長谷 篤: 感染性胃腸炎患者からのパレコウイルスの検出, 平成 25 年度地方衛生研究所全国協議会

- 近畿支部ウイルス部会総会，大津  
(2013.9.20)
33. 山元誠司，入谷展弘，改田 厚，久保英幸：2013年4～5月に大阪市内で流行したロタウイルス (G1-P[8]-I2) の遺伝子解析，第61回日本ウイルス学会，神戸 (2013.11.10-12)
  34. 山本美和子，伊藤文明，野田衛 (2014) 広島市で検出された A 型肝炎ウイルスの分子疫学的解析，第62回日本ウイルス学会学術集会，横浜市，11/10
  35. 秋野和華子，斎藤博之，田中智之，野田 衛 (2014) 食品検体からのパンソルビン・トラップ法によりノロウイルス RNA を抽出する際の  $\alpha$ -Amylase 処理に関する検討，第35回日本食品微生物学会学術総会，堺市，9/18
  36. 秋野和華子，斎藤博之，野田 衛 (2015) 食品のウイルス検査における偽陽性防止対策に関する検討，第36回日本食品微生物学会学術総会，川崎市，11/12
  37. 重本直樹，谷澤由枝，島津幸枝，高尾信一，田中智之，野田 衛，福田伸治 (2013) 蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法による小児胃腸炎患者からの下痢症ウイルスの検出，第61回日本ウイルス学会学術集会，神戸市，11/11
  38. 小菅大嗣，上間 匡，小西良子，野田 衛 (2015) 市販アルコール系消毒剤によるネコカリシウイルス不活化効果の比較，第110回日本食品衛生学会学術講演会，京都市，10/30
  39. 小林慎一，中村範子，安達啓一，伊藤 雅，安井善宏，山下照夫，皆川洋子：平成24年度の愛知県におけるノロウイルスの検出状況 (12/13 シーズン)，第61回日本ウイルス学会学術集会，神戸市 11/11 (2013)
  40. 照山 晏菜，三元 昌美，上間 匡，野田 衛 (2014) 感染性推定遺伝子検査法を用いた市販カキのノロウイルス汚染調査，第108回日本食品衛生学会，金沢市，12/5
  41. 上間 匡，野田 衛，春名美香，佐々木貴正 (2014) カキおよびムラサキイガイから検出されたノロウイルス遺伝子の次世代シーケンサーによる比較解析，第35回日本食品微生物学会学術総会，堺市，9/18
  42. 上間 匡，三元昌美，青沼えり，野田 衛 (2013) ノロウイルスのリスク評価のための感染性推定遺伝子検査法の開発，第106回日本食品衛生学会学術講演会，宜野湾市，11/22
  43. 上間 匡，三元昌美，青沼えり，栗原慶隆，野田 衛 (2013) ノロウイルスの感染性推定遺伝子検査の開発と応用，第34回日本食品微生物学会学術総会，江戸川区，10/3
  44. 上間 匡，照山晏菜，堀内百恵，浅川 愛，三元昌美，野田 衛 (2015) カキからのノロウイルス検出における通知法，改良法，感染性推定遺伝子検査法の比較，第110回日本食品衛生学会学術講演会，京都市，10/30
  45. 上間匡，三元昌美，青沼えり，栗原慶隆，照山晏菜，堀内百恵，溝口嘉



- 範, 高橋肇, 木村 凡, 野田 衛 (2014) ノロウイルスの代替ウイルスとしてのネコカリシウイルスの評価, 第108回日本食品衛生学会, 金沢市, 12/5
46. 上間匡, 野田衛, 春名美香, 佐々木貴正 (2014) 二枚貝から検出されたノロウイルス遺伝子産物の網羅的解析, 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜市, 11/10
47. 森功次ほか: ウイルス性胃腸炎検査における SPIA (Single Primer Isothermal Amplification) 法導入に関する検討. 第35回日本食品微生物学会学術総会, 2014, 堺市
48. 森功次ほか: ノロウイルス胃腸炎における感染性粒子推定遺伝子検査法を用いた発症者および調理従事者の比較. 第36回日本食品微生物学会学術総会, 2015, 川崎市
49. 森功次ほか: 東京都において集団胃腸炎事例から検出された Sapovirus について, 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013, 神戸市
50. 菅原直子, 木村俊介, 鈴木優子, 佐々木美江, 植木 洋, 渡邊 節, 真砂佳史, 大村達夫, 野田 衛 (2015) カキからのノロウイルス抽出法の検討, 第36回日本食品微生物学会学術総会, 川崎市, 11/12
51. 青沼えり, 上間 匡, 三元昌美, 野田 衛 (2013) ウイルスの食品検査の精度管理に関する基礎的研究, 第34回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/3
52. 青木里美, 山下育孝, 菅 美樹, 服部昌志, 大倉敏裕, 野田 衛, 四宮博人 (2013) 2012/2013 シーズンに検出されたノロウイルス GII.4 の分子疫学的解析, 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 11/12
53. 中村範子, 尾内彩乃, 廣瀬絵美, 安達啓一, 伊藤 雅, 安井善宏, 小林慎一, 山下照夫, 皆川洋子: 愛知県における胃腸炎ウイルスの流行状況 (2008/09~2013/14), 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡市, 11/22 (2015)
54. 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 上林大起, 野田 衛 (2015) 大阪市におけるノロウイルス GII.17 の流行状況, 第63回日本ウイルス学会学術集会, 福岡市, 11/22
55. 入谷展弘, 改田 厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 後藤 薫, 長谷 篤: 2012-2013 シーズンに大阪府で認められたノロウイルス流行について, 第25回ウイルス性下痢症研究会学術集会, 神戸 (2013. 11. 9)
56. 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 上林大起, 久保英幸, 野田 衛: 大阪市におけるノロウイルス GII.17 の流行状況, 第63回日本ウイルス学会, 福岡 (2015. 11. 22-24)
57. 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 岡智一郎, 久保英幸: 2012/13 シーズンに大阪府で多発したサポウイルス集団胃腸炎事例, 第61回日本ウイルス学会, 神戸 (2013. 11. 10-12)

58. 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 久保英幸, 野田 衛: 2013/14 シーズンに大阪市において集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルス GII.6 株の分子疫学的解析, 第 62 回日本ウイルス学会, 横浜 (2014. 11. 10-12)
59. 入谷展弘, 山元誠司, 改田厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 野田衛 (2014) 2013/14 シーズンに大阪市において集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルス GII.6 株の分子疫学的解析, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜市, 11/10
60. 本村 和嗣, 大出 裕高, 横山 勝, 中村浩美, 佐藤 彩, 岡 智一路, 片山 和彦, 野田 衛, 武田直和, 田中 智之, 佐藤 裕徳 (2013) ノロウイルス感染者体内における混合感染の実態, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 11/12
61. 名古屋真弓, 稲崎倫子, 嶋一世, 板持雅恵, 稲畑良, 小渕正次, 野田衛, 佐多徹太郎, 滝澤剛則: 胃腸炎集団発生事例のメタゲノム解析によるノロウイルスの検索. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡市, 平成 27 年 11 月 22 日
62. 名古屋真弓, 稲崎倫子, 板持雅恵, 嶋 一世, 堀元栄詞, 小渕正次, 野田 衛, 佐多徹太郎, 瀧澤剛則 (2013) 患者・下水・岩ガキからのノロウイルス・サポウイルスの検出, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 11/11
63. 名古屋真弓, 稲崎倫子, 板持雅恵, 嶋一世, 堀元栄詞, 小渕正次, 野田衛, 佐多徹太郎, 滝澤剛則: 富山県における患者・下水・岩ガキからのノロウイルス・サポウイルスの検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 平成 25 年 11 月 11 日
64. 野田 衛 (2013) 2012/13 シーズンのノロウイルス食中毒発生状況, ウィルス性下痢症研究会第 25 回学術集会, 神戸市, 11/9
65. 野田 衛, 上間 匡, 三元昌美, 山下育孝, 青木里美, 小林慎一, 斎藤博之 (2014) パンソルビンを用いた抗体被覆/非被覆ウイルス粒子鑑別法の開発と応用, 第 35 回日本食品微生物学会学術総会, 堺市, 9/18

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」

総合研究分担報告書(平成 25～27 年度)

## パンソルビン・トラップ法による食品中の病原ウイルス検査の実用化

研究分担者 齋藤博之 秋田県健康環境センター・保健衛生部  
研究協力者 秋野和華子 秋田県健康環境センター・保健衛生部

### 研究要旨

食中毒対策の一環として、どのような食品に対してもウイルス検査ができるパンソルビン・トラップ法の開発を進めている。平成 25 年度は結果のバラつき要因の洗い出しと対策、平成 26 年度は医療用ガンマグロブリンから工業用への切り替えと評価、平成 27 年度はノロウイルスに続いてサポウイルスの RT-PCR 反応系最適化を目的とした。

結果のバラつきを抑制するため、RT-PCR に用いる酵素の選択、 $\alpha$ -Amylase の不溶性成分の除去、非加熱型 DNase 処理について検討した。医療用と工業用のガンマグロブリンを用いて各種ウイルスの回収率を比較した。パントラ法で回収されたサポウイルスの RNA を検出するに当たって、逆転写反応専用プライマーを設計し、LNA 修飾を用いた高温 PCR を検討した。

逆転写酵素と PCR 酵素を適切に選択することで、非特異反応を抑制できた。あらかじめ  $\alpha$ -Amylase 粉末を液化調製しておくことで、不溶性成分による阻害を防げた。DNase のオンカラム処理により、試験中の RNA 減少が抑えられた。工業用ガンマグロブリンを医療用のそれと置き換えても同等以上の効果が見込めることを確認し、研究用試薬として一般購入できるような供給体制を整えた。サポウイルスの検出において、専用プライマーによる逆転写反応を行い、さらに PCR プライマーに LNA 修飾を導入することで非特異反応を抑制できた。以上のことから、本研究の目的は十分に達成されたものと考えられた。

### A. 研究目的

ウイルス性食中毒の対策として二枚貝の汚染実態調査や、調理従事者への衛生教育等が進められてきている。しかしながら、原因として疑われる食品からのウイルス検出は、その作業の困難さからこれまでほとんど検討されてこなかったため、具体的な汚染ルート

の解明に決め手を欠いていた。原因物質としてはノロウイルス(NoV)が大部分を占めているが、他にもサポウイルス(SaV)やアデノウイルス41型(AdV41)に代表される腸管系アデノウイルスも含まれている。さらに、輸入食品等が原因と考えられる A 型肝炎ウイルス(HAV)感染者の報告が急増するなど、食

品中のウイルスを検出する方法の確立が急務となっている。平成 19～21 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルスの制御に関する研究」(H19-食品-一般-016)において、固形、液状、練り物、油物などの一般的な食品から NoV を検出する手法としてパンソルビン・トラップ法(パントラ法)を開発し、この問題を解決するための糸口を見出すことができた。その後、平成 22～24 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」(H22-食品-一般-013)において、市販のガンマグロブリン製剤を利用することで添加抗体の安定供給が図られた他、検出した遺伝子の塩基配列解析も可能な方法として発展させることができた。一方、平成 24 年度に実施した共通試薬とノロウイルスを含む共通検体を用いたコラボ・スタディにおいて、試験機関ごとの結果のバラつきが問題となった。また、捕捉抗体の汎用化のために導入したガンマグロブリン製剤は医療用のものであるため、試験検査目的で利用するにはいくつかの制限があり、試薬用のガンマグロブリンを調達することが求められた。さらに、ノロウイルスと並んで食中毒原因物質にあげられるサポウイルスに関しての対応も必要であった。本研究事業ではこれまでの手法を発展させ、実際の食中毒事例に適用するための汎用化を実現することを目的とする。同時に、実用局面において不具合が生じる部分を洗い出して改良を加えるものとする。実用化に向けて検討すべき課題は次の 4 点に集約される。

①試験機関によって結果のバラつきが生じやすい部分として、次の 4 箇所を想定した。この内、(1)はウイルス RNA 抽出段階(狭義

のパントラ法)のものであり、(2)～(4)は抽出した RNA の検出段階に相当する。

(1)  $\alpha$ -Amylase 粉末の不溶性成分の残留に関する問題

(2)抽出した RNA 溶液に対する DNase 処理の問題

(3)逆転写酵素の選定と反応条件最適化

(4)PCR 酵素の選定と反応条件最適化

②市販のガンマグロブリン製剤は医薬品であり、薬事法に規定される使用者義務が課せられるため、購入・使用が困難な場合がある。そのため、医薬品ではない試薬用のガンマグロブリンを検討する必要がある。

③遺伝子解析技術の高度化に伴い、現行の PCR プライマーによる増幅領域を全て含む遺伝子断片を扱う機会が増えることから、食品検査における偽陽性対策(コンタミ対策)を強化する必要がある。

④NoV 以外の食中毒起因ウイルス、とりわけサポウイルスに対しても検出系を最適化する必要がある。

研究のスケジュールとしては、平成 25 年度に課題①を、平成 26 年度に課題②と③を、平成 27 年度に課題④を解決するための検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 研究材料

汚染実験に用いる食品として、市販されているポテトサラダと焼きそばを用いた。酵素選択のための負荷試験の希釈媒体として、市販のきな粉からのパントラ抽出物を用いた。また、検出対象ウイルスである、NoV-GI.4、GII/3、GI.6、GII.2、GII.4、GII.6、SaV-GI.1、GII.3、GIV.1、GV.1、及び AdV41 については秋田県内の集団感染事

例とサーベイランス定点から得られた糞便を用いた。同じく検出対象とした HAV については不活化ワクチン(「エイムゲン」化血研)を用いた。

## 2. 試薬類

### 1) 食品洗滌液

Tris-HCl (pH8.4) – 0.5M NaCl – 0.1% Tween20 を調製して使用した。

### 2) 食品処理袋

サニスペックテストバッグ(アズワン)を使用した。

### 3) 医療用ガンマグロブリン製剤

米国 Baxter 社の 5% 静注用ガンマグロブリン製剤「Gammagard」を用いた。Alfresa Pharma 社から購入した。

### 4) 工業用ガンマグロブリン

米国 HDM Labs Inc.社の工業用ガンマグロブリン粉末を、アドビー・ジャパン社を通じて購入し、蒸留水にて 5% 溶液とした。

### 5) パンソルビン

黄色ブドウ球菌を熱処理してホルマリン固定したものの懸濁液で、メルク社から購入した。

### 6) フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen)を使用した。

### 7) カラム方式の RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を使用した。

### 8) 再懸濁液

10)の抽出キット添付の AVL 液を用いた。

### 9) DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの製品を使用した。

### 10) アミラーゼ

枯草菌由来  $\alpha$ -Amylase 粉末(和光純薬)を使用した。このとき、液化調製法について

も検討した。

### 11) 逆転写酵素

平成 25 年度報告書・表 2 に示す 6 種類の酵素を使用した。

### 12) PCR 用酵素

平成 25 年度報告書・表 1 に示す 23 種類の酵素を使用した。

### 13) 逆転写反応に用いたプライマー

NoV に対しては、ランダムプライマー (9mer, タカラバイオ)、及び逆転写反応専用プライマー PANR-G2 (Food and Environmental Virology, 7, 239-248, 2015)を用いた。SaV に対しては、新規開発の逆転写反応専用プライマー PANR-SV を、HAV と AdV41 に対しては、real-time PCR のリバーズ側プライマーを用いた。

### 14) Uracil-N-Glycosylase (UNG)

Antarctic Thermolabile UDG (New England BioLabs)を用いた。

## 3. パントラ法の手順

基本的な操作の流れを図 1 に示した。なお、ウイルスと抗体の反応性を確認するための試験(表 1 と 2)では食品を含まない食品洗滌液のみであることから、超音波処理と  $\alpha$ -Amylase 処理は省略した。

## 4. ウイルスの検出

AdV41 については図 1 の抽出液をそのまま用い、real-time PCR 検出系 (J. Clin. Microbiol. 44, 3189-3195, 2006) でコピー数を測定した。NoV、SaV、及び HAV については、図 1 で得られた抽出液に含まれる RNA を鋳型として、cDNA を合成した(反応容量 20 $\mu$ L)。このとき、既知の濃度の RNA

をパントラ抽出物で段階希釈したものをを用いて逆転写酵素やプライマーなどの反応条件を比較検討した。

合成した cDNA 溶液を 5 $\mu$ L 取り、NoV については Kageyama ら (J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003)、SaV については Oka ら (J. Med. Virol. 78, 1347-1353, 2006)、HAV については、国立感染症研究所病原体検出マニュアル (A 型肝炎、平成 18 年 8 月版) の real-time PCR によりウイルスを検出した。使用した機器はロシュ製「LightCycler 350S」、及び「LightCycler 480」で反応容量は 20 $\mu$ L である。

さらに NoV と SaV に対しては、既知の DNA 溶液をパントラ抽出物で段階希釈したものをを用い、PCR 酵素やプライマーなどの反応条件を比較検討した。このときの conventional PCR は、NoV に対しては Kojima ら (J. Virol. Methods, 100, 107-114, 2002.) の方法、SaV に対しては Kitajima ら (Appl. Environ. Microbiol., 76, 2461-2467, 2010.) の方法を用いた。

#### 5. 偽陽性対策に関する検討

日常の検査業務への影響を回避するため、ブロッコリーの遺伝子を用いた (業務では植物遺伝子を扱わない)。蒸留水で段階希釈することで、 $10^4$ ~ $10^1$  コピー/ $5\mu$ L のブロッコリー遺伝子由来増幅産物を含む被検体を調製した。この被検体を、食品検査においてキャリーオーバーによって混入した PCR 産物と仮定し、UNG 添加による無効化、あるいは Ct 値により鑑別する方法を検討した。

### C. 研究結果

#### 1. 結果のばらつき要因の洗い出しと対策

##### 1) $\alpha$ -Amylase 粉末の液化調製

これまで、食品中の炭水化物を分解するために  $\alpha$ -Amylase 粉末を添加していたが、粉末には不溶性成分 (賦形剤) が含まれており、遠心による除去が不十分だと結果のばらつきに繋がるのがわかった。そこで、図 2 に示した手順により、あらかじめ液化調製しておいたものを使用することで、この問題を解決した。図 3 に示すように液化調製した酵素は粉末と同等にデンプンを分解し、 $-20^{\circ}\text{C}$  に 1 年間保存した後も同じ結果がえられた。

##### 2) オンカラム DNaseI 処理の考案

夾雑する DNA を除去するために、逆転写反応の前に DNaseI 処理を行うことが一般的であるが、その際に使用済みとなった DNaseI を不活化するのに  $75^{\circ}\text{C}$  5 分の加熱を行っていた。ところが、この加熱処理によって RNA が化学的に分解し、検出感度の低下をもたらすことがわかった。本研究では、図 4 に示した、オンカラム処理を取り入れることで非加熱条件での操作を可能とした。図 5、図 6 に示したとおり、RNA 量の減少は認められない。易熱性 DNase (HL-dsDNase) を用いても同じ結果が得られるが、我が国では販売されていないことから、オンカラム処理の方が実用的である。

##### 3) 逆転写酵素の選定と反応条件最適化

パントラ法で抽出された RNA サンプルには大量の黄色ブドウ球菌の遺伝子が含まれていることから、その影響を受けないような反応条件を設定する必要がある。市販されている逆転写酵素を用いて、NoV GII.4 の RNA からの逆転写効率を比較したところ、図 7 のとおり Transcriptor (Roche

diagnostics)による 58°Cの反応が最適であった。

#### 4) PCR 酵素の選定と反応条件最適化

逆転写反応の場合と同じく、PCR の段階においても黄色ブドウ球菌遺伝子の影響を受けないような反応条件を設定する必要がある。市販されている PCR 酵素 23 種類(バッファーとの組み合わせで 32 種類)について、パントラ抽出物で段階希釈した NoV の DNA 断片を増幅したところ、AptaTaq Fast PCR Master (Roche Diagnostics)に抗 Taq 抗体を加えてホットスタート化したものが最適であった。この酵素選定の条件として、反応効率の他に、基質として dUTP を用いることができる点を加えた。これは、後の検討で UNG 処理による偽陽性対策を行うための布石である。

## 2. 工業用ガンマグロブリンの有用性の検証

食品洗滌液 50mL に NoV-GII.4 を投入し、工業用ガンマグロブリン(図 9)の添加量を変えて回収率を比較した結果を表 1 に示した。回収率は、5%ガンマグロブリンを 150  $\mu$ L 添加する条件で最適化された。ここで最適化された添加量の工業用ガンマグロブリンを用いて、種々の遺伝子型の NoV(表 2)、SaV(表 3)、及び HAV と AdV41(表 4)への反応性を確認した。その結果、本研究で用いたウイルスについては、工業用ガンマグロブリンは医療用と比べて同等以上の反応性を有していることが明らかとなった。同様の結果は、実際の食品検体を用いた添加回収試験においても得られており(表 5)、工業用ガンマグロブリンの有用性が証明された。以上の結果を踏まえて、工業用ガンマグロブリンを試薬として包装されたものが一般に

購入できるようになった(図 9)。

## 3. 偽陽性対策に関する検討

T の塩基が U に置換された PCR 産物は、UNG で処理することで特異的に分解され、以後の結果判定に影響しなくなることが示された(図 10)。また、2nd.PCR で real-time PCR を用いた場合において、最初からウイルスが陽性のならば、20 サイクル未満の早い段階で増幅カーブが認められた(図 11)。偽陽性を抑制するためには、図 12 に示すとおり、日常の PCR には全て dUTP が含まれる反応系を使用し、1st.PCR の際に UNG 処理を行うことで、前回までの PCR 産物の混入を無効化する方法が有効である。また、2nd. PCR に real-time PCR を用い、Ct 値に着目することで、途中からの PCR 産物の混入を判別することが可能である。

## 4. SaV に対する反応系最適化

SaV の RNA を検出するに当たっても、NoV の場合と同様に黄色ブドウ球菌遺伝子の影響を受けないような反応条件を設定する必要がある。SaV の検出に常用されている Kitajima 法に用いるプライマーの中で、特に T<sub>m</sub> 値が低いものがあり、そのため PCR のアニーリング温度が原法では 50°C になっている。パントラ法でこの条件を用いた場合には、大量の黄色ブドウ球菌遺伝子に対する副反応に酵素活性が奪われ、SaV の増幅効率が低下する。そこで、T<sub>m</sub> 値の低いプライマーに LNA (Locked Nucleic Acid) 修飾を導入し、強制的に T<sub>m</sub> 値を上昇させることで高いアニーリング温度での PCR が可能となった。図 13、図 14 に示すとおり、アニーリング温度を 60°C に設定するこ

とで SaV 遺伝子が特異的に増幅されていることがわかる。同様に、SaV の real-time PCR の反応系である Oka 法においても、Tm 値の低いプライマーに LNA を導入することで、感度が向上した(図 15)。

逆転写反応においては、ランダムプライマーを用いると黄色ブドウ球菌遺伝子への副反応によって感度が2桁低下することがわかった。新規開発の逆転写反応専用プライマー-PANR-SV を用いることで、conventional PCR (図 16)と real-time PCR(図 17)のいずれにおいても、感度低下を避けることができた。なお、本稿では SaV GI.1 を試験材料としたが、GI.2、GII.3、GIV.1、GV.1についても同様の結果が得られることを確認している。

#### D. 考察

##### 1. 結果のばらつき要因の洗い出しと対策

本法はすでに複数の実事例において食品からの NoV の検出に成功していることから、プロトコルとしては完成の域にあるものと考えられる。しかし、実施する機関が増えるにつれて、検出精度にバラつきを生じることになるため、あらかじめ対策を講じておくことが必要である。そこで本研究では、結果に影響を及ぼすと考えられる箇所を次の4点に絞り、それぞれにおいて最適化を図った。

##### 1) $\alpha$ -Amylase 粉末の不溶性成分の混入防止

パントラ法では食品中の炭水化物を分解除去するために  $\alpha$ -Amylase 粉末を添加しているが、この粉末には賦形剤が含まれているため完全には溶解しない。その後の工程において、3,000rpm 30分の遠心によって食品残渣を沈澱除去する際に、この不溶

性成分も一緒に取り除くことが可能であるが、そのためにはスポイトで上清を丁寧に別チューブに分離する必要がある。検体数が多い場合には、この操作はかなりの負担となり得る。しかし、デカントによって簡便に上清を分離した場合には、不溶性成分の残留は避けられず、検出結果にも影響する。そこで、本研究では  $\alpha$ -Amylase 粉末から不溶性成分を除去して液化調製(図 2)することで問題解決を図った。液化調製した  $\alpha$ -Amylase は、粉末と同様に炭水化物を分解できることが確認された(図 3)。

##### 2) DNase 処理にともなう RNA 分解防止

これまでにカキ等のウイルス検査において、カキ本体由来の DNA を除去するために逆転写反応の前に DNase 処理を行うことが推奨されてきた。パントラ法で抽出された RNA にも大量の黄色ブドウ球菌由来の DNA が混入することから、非特異反応を抑制するためにも DNase 処理は有効な手法と考えられる。しかし一方で、DNase 処理で一般的に用いられる酵素である DNase I は、反応後の失活に 75°C 5分の加熱を必要とすることから、肝心のウイルス RNA が分解・減少してしまうという難点があった。極微量のウイルス RNA を扱う食品検査において、この問題は看過し得ないものと考えられる。加熱を要しない易熱性 DNase を用いることで解決を図ることができるが、この酵素は我が国では市販されていない。そこで、一般的に入手可能な DNase I を利用する方法として、図 4 に示したオンカラム処理法を考案した。パントラ法の RNA 抽出工程に組み入れていることから、最も利便性が高く、ウイルス RNA の減少は認められなかった(図 5、図 6)。易熱性 DNase は輸入手続きを行えば入手可能で



あることから、各機関の実状に合わせて選択することが可能である。

### 3) 逆転写反応系の最適化

市販の逆転写酵素は、その由来が様々であり、反応至適温度も異なっている。本研究の目的は黄色ブドウ球菌遺伝子の影響を抑えて、NoV 遺伝子だけを特異的に検出することであるから、反応温度は高い方が望ましい。一方、温度が高すぎると逆転写プライマーの親和性が低下し、必然的に感度も低下する。これらの条件のバランスの上で、最適条件をさがしたところ、58℃であった。また、この温度条件を至適温度とする酵素は Transcriptor (Roche Diagnostics) であった(図 7)。

### 4) PCR 反応系の最適化

23 種類の PCR 酵素を比較検討した結果、黄色ブドウ球菌遺伝子の影響を受けないためにはホットスタート仕様が必須であった。また、後に予定されている偽陽性防止対策のためには基質として dUTP を取り込める酵素である必要がある。以上の条件を加味して、パントラ抽出存在下での負荷試験を行ったところ、AptaTaq Fast PCR Master (Roche Diagnostics) が第一選択となった(図 8)。

## 2. 工業用ガンマグロブリンの有用性の検証

パントラ法の基本原理は、黄色ブドウ球菌の表面に、捕捉抗体を介してウイルス粒子を吸着させて回収・検出することである。開発段階においてはウイルス捕捉抗体の供給源として医療用ガンマグロブリン製剤を用いてきた。医療用のガンマグロブリンを試験検査目的に使うことは、法的な問題は無いものの、オフラベルユース(想定外使用)であることか

ら薬事法に規定される様々な制限が課せられることになる。本研究では、これらの課題を根本的に解決し、食品のウイルス検査の円滑な普及に繋げるために、医薬品ではない、工業用ガンマグロブリン(図 9)を用いることを検討した。最適添加量は、表 1 に示すとおり医療用のものと同じで、プロトコルの変更は不要であった。表 2~5 に示したように、各種回収試験においても、工業用ガンマグロブリンは、医療用のものと同様以上の結果が得られることがわかった。

## 3. 偽陽性対策に関する検討

パントラ法が普及するにつれて、実験室内汚染による偽陽性の問題が浮上してくることが想定される。近年の遺伝子解析技術の高度化に伴って NoV の PCR プライマーの配置部位を全て包含するような DNA 断片を扱う機会が増えてきている。遺伝子解析のために増幅産物を電気泳動ゲルから切り出し精製する操作では  $10^{12} \sim 10^{15}$  コピー/ $\mu\text{L}$  に相当する高濃度の DNA 断片を扱うことから、封じ込めだけでは限界がある。

本研究では、図 10 に示すように T の代わりに U を含む PCR 産物を特異的に分解する UNG を用いて、1st.PCR 時に混入した DNA 断片を無効化している。また、2nd.PCR 時に DNA 断片が混入した場合でも、図 11 に示すように Ct 値で判別(20 サイクル以上は再試)が可能と考えられた。図 12 に示すとおり、日常の PCR は全て dUTP を用いるように反応系をデザインしておけば、偽陽性を抑制する効果が見込める。先に第一選択とした PCR 酵素である AptaTaq Fast PCR Master は、最初から基質として dUTP が使われているためこの目的に合致

している。

#### 4. SaV に対する反応系最適化

先に NoV に対して黄色ブドウ球菌遺伝子の影響を受けない反応条件を検討したが、SaV に対しても同様な条件最適化が必用である。SaV の場合は、RT-PCR (Kitajima 法) と real-time PCR (Oka 法) のいずれにおいても  $T_m$  値の低いプライマーが含まれており、アニーリング温度を低くせざるを得ない部分がある。糞便検体ではそれでも差支えないが、パントラ抽出物の場合は黄色ブドウ球菌遺伝子に対する副反応が無視できない。本研究では、 $T_m$  値の低いプライマーに対して LNA 修飾を導入することで、アニーリング温度を高く設定することが可能となった。図 13~15 に示すとおり、黄色ブドウ球菌遺伝子の影響を抑え、検出感度を高める効果が認められた。逆転写反応においては、新規設計の専用プライマーを用いることで、RT-PCR(図 16) と real-time PCR(図 17) の双方で感度を維持することができた。

#### 5. 今後の課題

他の食中毒起因ウイルスとしては、近年報告が増加しつつある E 型肝炎ウイルス等への適用を進める必要があるが、捕捉抗体の供給源を確保することが重要である。同様に NoV や SaV であっても、新たな型に対応するためには、疫学調査と並行して捕捉抗体の見直しを継続していかなければならない。

さらに、本法が有効に活用されるためには、適切な食品サンプルの確保が重要である。具体的には、実際に食卓に供せられる段階の検食(調理から盛り付けのプロセスを経た

もの)を保存するという原則を、事業者に周知する必要がある。また、ウイルスは食品中では増えず付着するのみであることから、分取した食品サンプルに付着していなければ陰性となってしまふ。そのため、サンプリングプランや、スケールアップの方法についても検討する余地が残されている。加えて、今後はウイルスの回収効率を客観的に評価する必要性も生じてくることから、内部標準物質の使用についても検討を進める必要がある。

#### E. 結論

パントラ法における添加抗体の供給源として工業用ガンマグロブリン製剤を用いることで、薬事法に伴う制約がなくなり、普及が容易となった。また、NoV と SaV に対して RNA 検出系の最適化を行い、黄色ブドウ球菌遺伝子の影響を受けずに感度を維持できる反応条件を設定した。さらに、実施機関が増えるにつれて問題となる結果のばらつきが起きやすい箇所を想定し、 $\alpha$ -Amylase の液化調製法や DNase I のオンカラム処理法を導入した。一方で、遺伝子解析の高度化に伴って問題となる偽陽性対策として UNG 処理を導入した。本法は平成 26 年に浜松市で発生した実際の食中毒事例で活用することができた。今後は、新たな食中毒起因ウイルスへの対応や、反応系のスケールアップ、及び回収率を評価するための内部標準の導入などが課題となる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

## 1. 論文発表

1) 斎藤博之、野田衛: 食品・臨床材料・ふき取りの前処理法, 食品衛生検査指針 2015(微生物編), 607-617 (2015)

2) 斎藤博之: 一本鎖高次構造多形(SSCP)解析法, 食品衛生検査指針 2015(微生物編), 648-654 (2015)

3) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、柴田ちひろ、佐藤由衣子、安部真理子、飯塚禮子、木内雄: 死亡例を含むA型肝炎の家族内感染事例, 病原微生物検出情報, 36(5), p15 (2015)

4) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Tomoyuki Tanaka and Mamoru Noda: Development of a practical method to detect noroviruses contamination in composite meals. *Food and Environmental Virology*, 7(3), 239-248 (2015)

## 2. 学会発表

1) 斎藤博之、須藤恒久、田中智之、野田衛: 食品検体からパンソルビン・トラップ法で抽出したノロウイルス RNA の検出系に関する検討, 第 34 回日本食品微生物学会学術総会, 2013、東京

2) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛: パンソルビン・トラップ法によって抽出されたノロウイルス RNA の効率的な検出に関する検討, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013、神戸

3) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛: 食中毒事例における食品のノロウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化, 第 106 回日本食品衛生学会学術

講演会, 2013、沖縄

4) 斎藤博之、Ratigorn Guntapong、武田直和: タイ王国における食品の安全キャンペーンと、食品中のウイルス検査法としてのパンソルビン・トラップ法の導入, 秋田応用生命科学研究会第 23 回講演会, 2012、秋田

5) Hiroyuki Saito, Tomoyuki Tanaka, Miho Toho, Mamoru Noda, Tomoichiro Oka and Kazuhiko Katayama : Noroviruses RNA detection in contaminated foods by a PANtrap method, The 2nd. AFSA Conference on Food Safety and Security, 2014, Bien Hoa City, Vietnam.

6) 斎藤博之、秋野和華子、田中智之、野田衛: 食品検体のノロウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の捕捉抗体供給源に関する検討, 第 35 回日本食品微生物学会学術総会, 2014、堺

7) 秋野和華子、斎藤博之、田中智之、野田衛: 食品検体からパンソルビン・トラップ法によりノロウイルス RNA を抽出する際の  $\alpha$ -Amylase 処理に関する検討, 第 35 回日本食品微生物学会学術総会, 2014、大阪

8) 斎藤博之、秋野和華子、田中智之、野田衛: パンソルビン・トラップ法における捕捉抗体の供給源に関する検討, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014、横浜

9) 斎藤博之、秋野和華子、田中智之、野田衛: 食中毒事例における食品のノロウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化, 第 108 回日本食品衛生学会学術講演会, 2014、金沢

10) 斎藤博之、秋野和華子、田中智之、野田衛: 食品のノロウイルス汚染を検出す

るパンソルビン・トラップ法の開発、あきた産学官連携フォーラム 2014、2014、秋田

11) 斎藤博之、秋野和華子、田中智之、野田衛:食品のウイルス検査法における捕捉抗体の供給源に関する研究、第 25 回秋田応用生命科学研究会講演会、2015、秋田

12) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛:食品のサポウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化、第 36 回日本食品微生物学会学術総会、2015、川崎

13)秋野和華子、斎藤博之、野田衛:食品のウイルス検査における偽陽性防止対策に関する検討、第 36 回日本食品微生物学会学術総会、2015、川崎

14) Hiroyuki Saito, Wakako Akino, Mamoru Noda : Optimization of RT-PCR to detect Sapovirus RNA recovered by PANtrap method. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015、福岡

15) 斎藤博之、秋野和華子、田中智之、野田衛:食品検体の病原ウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の捕捉抗体供給源に関する検討、第 110 回日本食品衛生学会学術講演会、2015、京都

16) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛: LNA (Locked Nucleic Acid)修飾プライマーを用いたサポウイルス RNA 検出系の最適化、秋田応用生命科学研究会第 26 回講演会、2015、秋田

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし